



F1

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 5/04, A61K 47/48		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/15571 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. April 1998 (16.04.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05189 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. September 1997 (22.09.97) (30) Prioritätsdaten: 196 40 970.5 4. Oktober 1996 (04.10.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESellschaft [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHEN, Hans-Georg [DE/DE]; Süderstrasse 3, D-51375 Leverkusen (DE). VON DEM BRUCH, Karsten [DE/DE]; Bonifatiusstrasse 2, D-51375 Leverkusen (DE). BAUMGARTEN, Jörg [DE/DE]; Henselweg 13, D-42115 Wuppertal (DE). SPERZEL, Michael [DE/DE]; Normannenstrasse 31, D-42275 Wuppertal (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESellschaft; D-51368 Leverkusen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: MODIFIED CYTOSTATIC AGENTS (54) Bezeichnung: MODIFIZIERTE CYTOSTATIKA (57) Abstract <p>The invention concerns conjugates of cytostatic agents and N-thiocarbonyl-modified amino acids and peptides. The invention further concerns processes for their preparation and their use as medicaments, in particular in connection with cancers.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate aus Cytostatika und N-Thiocarbonyl-modifizierten Aminosäuren bzw. Peptiden, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

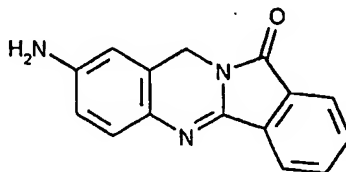
Modifizierte Cytostatika

Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate aus Cytostatika und N-Thiocarbonyl-
5 modifizierten Aminosäuren bzw. Peptiden, Verfahren zu deren Herstellung und
ihre Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit Krebser-
krankungen.

Die Chemotherapie bei Tumorerkrankungen ist begleitet von meist schwer-
wiegenden Nebenwirkungen, bedingt durch die Toxizität von Chemotherapeutika
10 auf proliferierende Zellen anderer Gewebe. Seit vielen Jahren beschäftigen sich
Wissenschaftler mit dem Problem der Verbesserung der Selektivität von einge-
setzten Wirkstoffen. Ein vielfach verfolgter Ansatz ist die Synthese von Prodrugs,
die mehr oder weniger selektiv im Zielgewebe beispielsweise durch Veränderung
des pH-Wertes (z.B. Tietze et al., DE 4 229 903), durch Enzyme (z.B. Glucu-
15 ronidasen; Jacquesy et al., EP 511 917; Bosslet et al., EP 595 133) oder durch
Antikörper-Enzym-Konjugate (Bagshawe et al., WO 88/07378; Senter et al.,
US PS 4 975 278; Bosslet et al., EP 595 133) freigesetzt werden. Problematisch
bei diesen Ansätzen ist u.a. die mangelnde Stabilität der Konjugate in anderen Ge-
weben und Organen und insbesondere die ubiquitäre Wirkstoffverteilung, die sich
20 an die extrazelluläre Wirkstofffreisetzung im Tumorgewebe anschließt.

Im folgenden werden beispielhaft drei cytostatisch aktive Grundkörper aus ver-
schieden Substanzklassen, die mit schweren Nebenwirkungen behaftet sind, vor-
gestellt.

Das heterocyclische Amin Batracyclin (1) zeigt in verschiedenen Darmkrebs-
25 Modellen eine gute Antitumorwirkung (US PS 4 757 072).

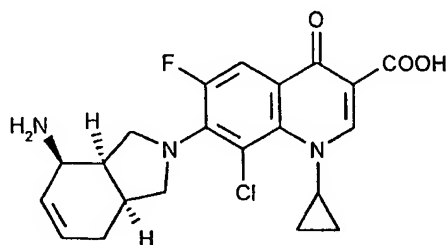


(1)

Peptidkonjugate von (1) mit guter In-vitro-Wirkung und günstigeren Löslichkeits-
eigenschaften (US 4 180 343) sind im Tierversuch schlechter verträglich als Batra-
cyclin selbst. So reichern sich z.B. die in EP 501 250 beschriebenen Fucose-

Konjugate sehr stark in der Leber an. Glycokonjugate von Cytostatika, wie sie in unserer ebenfalls anhängigen Anmeldung PCT/96/01279 beschrieben sind, weisen zwar günstigere Eigenschaften auf, sind aber synthetisch nur mit größerem Aufwand zugänglich.

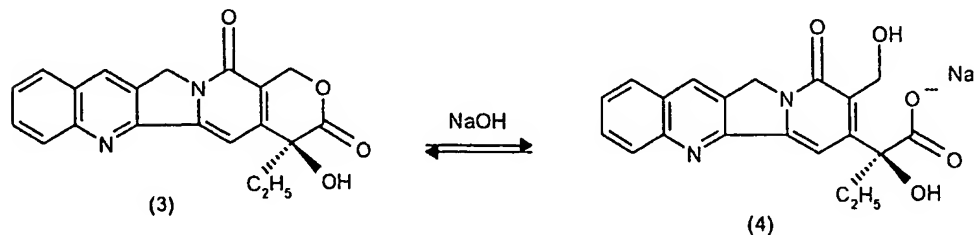
- 5 Das Chinolon-a (2) 7-[(3aRS, 4RS, 7aSR)-4-Amino-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-iso-indol-2-yl]-8-chlor-1-cyclopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-3-chinolincarbonsäure zeigt neben einer hervorragenden antibakteriellen Aktivität auch eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien (EP 520 240, JP 4 253 973). Dem stehen jedoch erhebliche toxikologische Probleme gegenüber
 10 (z.B. Genotoxizität, Knochenmarks-Toxizität, hohe akute Toxizität in vivo etc.).



(2) (Chinolon-a)

- 20(S)-Camptothecin (3) ist ein pentacyclisches Alkaloid, das 1966 von Wall et al. isoliert wurde (J. Amer. Chem. Soc. 88 (1966) 3888). Es besitzt ein hohes Anti-tumor-Wirkpotential in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Tests. Leider scheiterte
 15 jedoch die Realisierung des vielversprechenden Potentials in der Klinik an Toxizitäts- und Löslichkeitsproblemen.

- Durch Öffnung des E-Ring-Lactons und Bildung des Natriumsalzes wurde eine wasserlösliche Verbindung erhalten, die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der ringgeschlossenen Form steht. Klinische Studien führten auch hier bisher
 20 nicht zum Erfolg.



Etwa 20 Jahre später wurde gefunden, daß die biologische Aktivität auf eine Enzyminhibition der Topoisomerase I zurückzuführen ist. Seither wurden die Forschungsaktivitäten wieder verstärkt, um verträglichere und in vivo wirksame Camptothecin-Derivate zu finden.

- 5 Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden z.B. Salze von A-Ring- und B-Ring-modifizierten Camptothecin-Derivaten sowie von 20-O-Acyl-Derivaten mit ionisierbaren Gruppen beschrieben (Vishnuvajjala et al., US 4 943 579). Das letztere Prodrug-Konzept wurde später auch auf modifizierte Camptothecin-Derivate übertragen (Wani et al., WO 96/02546). Die beschriebenen 20-O-Acyl-
10 Prodrugs haben allerdings in vivo eine sehr kurze Halbwertszeit und werden sehr schnell zum Grundkörper gespalten.

- Wir fanden nun, daß die Modifizierung von Cytostatika wie z.B. Batracyclin, anti-tumoraktive Chinolone (wie z.B. Chinolon-a) oder Camptothecin bzw. Camptothecin-Derivate mit N-thiocarbonyl-modifizierten Aminosäuren zu neuen Ver-
15 bindungen mit überraschenden, hochinteressanten Eigenschaften führt:

- Die so erhaltenen Konjugate sind synthetisch gut zugänglich und zeigen in vitro eine ähnlich hohe Aktivität gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien und Tumorenografts wie das zugrundeliegende Toxophor.
- In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der N-thiocarbonyl-modifizierten Aminosäuren zeigen die erfindungsgemäßen Konjugate im Vergleich zu den zugrundeliegenden Cytostatika wesentlich verbesserte Löslichkeitseigenschaften.
20
- Sie weisen gegenüber den zugrundeliegenden Toxophoren eine höhere Verträglichkeit und Tumorselektivität auf.
- In vivo zeigen sie eine gute bis sehr gute therapeutische Aktivität.
25
- Sie sind in extrazellulärem Medium und in Blut wesentlich stabiler als die zuvor beschriebenen reinen Aminosäure-Prodrugs von Batracyclin, Chinolonen oder von Camptothecin-Derivaten.

- Im Fall von 20-O-Acylierungen von Camptothecin-Derivaten wird durch die esterartige Verknüpfung der Carrier-Reste mit der 20-Hydroxygruppe der für die Wirkung wichtige Lactonring stabilisiert.

Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



worin

$(\text{Ar-X-NH-C}(=\text{S})\text{---})_n$ für 1 bis n' gleiche oder voneinander verschiedene Gruppierungen

$\text{Ar-X-NH-C}(=\text{S})\text{---}$ steht, wobei n eine Zahl 1 bis n' bedeutet und n' der maximalen Zahl möglicher Anknüpfungsstellen von M entspricht,

10 worin

Ar für einen Arylrest mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen steht, der zusätzlich zu X gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert sein kann durch Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Alkoxy-carbonyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Carboxy, Carboxyalkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Cyano, Nitro, Isocyanato, Isothiocyanato, Halogen, Sulfonyl und/oder Sulfonamid,

15

X für eine direkte Einfachbindung oder für Alkylen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen steht,

M für ein Mono-, Di-, Tri- oder Tetrapeptid steht, das über die α -Aminogruppe und/oder über Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit den n gleichen oder voneinander verschiedenen Gruppierungen

20

$$\text{Ar-X-NH-C} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \end{array} \text{---}$$
 verknüpft ist, wobei weitere funktionelle Gruppen des Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können,

- C für einen Rest eines Cytostatikums oder eines Cytostatikum-Derivats steht, das über eine Aminofunktion oder über ein Sauerstoffatom mit M verknüpft ist,

sowie deren Stereoisomere, Stereoisomerengemische und Salze.

- C kann eine interkalierende Substanz, ein Topoisomerase-Inhibitor, ein Antimetabolit, ein Alkylanz, ein Tubulinhemmer, ein Tyrosinphosphokinase-Inhibitor, ein Proteinkinase-C-Inhibitor oder ein Wirkstoff mit einem anderen oder unbekannten cytostatischen oder cytotoxischen Wirkmechanismus sein. C kann beispielsweise ein Nucleosid, ein Endiin-Antibiotikum, eine Chinolon- oder Naphtyridoncarbonäure oder ein cytotoxisches Peptidantibiotikum z.B. aus der Klasse der Dolastatine sein. C kann Batracyclin, Chinolon-a, 5-Fluoruracil, Cytosinarabinosid, Methotrexat, Etoposid, Camptothecin, ein Camptothecin-Derivat, Daunomycin, Doxorubicin, Taxol, Vinblastin, Vincristin, Dynemicin, Calicheamycin, Esperamycin, Quercetin, Suramin, Erbstatin, Cyclophosphamid, Mitomycin C, Melphalan, Cisplatin, Bleomycin, Staurosporin oder ein anderer antineoplastisch aktiver Wirkstoff sein.

- 20 Der Begriff "Alkylgruppen" soll hierin sofern nicht anders angegeben geradkettige, verzweigte, cyclische und Cycloalkylreste enthaltende Alkylreste umfassen. Diese Definition soll sinngemäß auch für alle anderen Alkylgruppen enthaltenden Reste gelten, wie beispielsweise Alkoxy etc.

Bevorzugt sind Verbindungen der Formel (I), worin

- 25 Ar für einen Phenylrest steht, der para-ständig zu X noch Hydroxy, Carboxy, Isothiocyanato oder Halogen tragen kann.

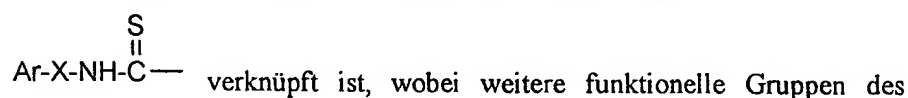
Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der Formel (I), worin

X für eine Einfachbindung oder für Methylen steht.

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der Formel (I),

worin

- 5 M für ein Mono-, Di- oder Tripeptid steht, das über die α -Aminogruppe und/oder über Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit den n gleichen oder voneinander verschiedenen Gruppierungen



Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können.

- 10 Bevorzugt bestehen die Peptide M aus Aminosäureresten, die sich ableiten von Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Histidin, Lysin, Arginin, Ornithin, Serin, Tyrosin, Valin, Diaminopropionsäure, α , γ -Diaminobuttersäure oder Phenylamin, wobei mehrere Aminosäurereste sowohl über die α -Aminogruppe als auch gegebenenfalls über die Seitenketten-Aminofunktionen oder auch über beide Funktionen peptidisch verknüpft sein können.

- 15 Falls M weitere funktionelle Gruppen trägt, so sind diese bevorzugt deblockiert.

- 20 Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der Formel (I), worin C für einen Batracylin-, Methotrexat-, Chinolon-a-, Etoposid-, Melphalan-, Taxol-, Camptothecin-Rest, ein im A-Ring oder B-Ring modifiziertes Camptothecin-Derivat, einen Daunomycin- oder Doxorubicin-Rest steht, wobei C über eine Amino- oder Hydroxyfunktion mit M verknüpft ist. Ganz besonders bevorzugte Beispiele für C sind Reste des Batracylin, Chinolon-a und Doxorubicin, Camptothecin, 7-Ethylcamptothecin; 10,11-(Methylendioxy)camptothecin; 7-Hydroxymethylcamptothecin und 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin.

- 25 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in stereoisomeren Formen, beispielsweise als Enantiomere oder Diastereomere, oder als deren Gemische, beispielsweise als Racemat, vorliegen. Die Erfindung betrifft sowohl die reinen Stereoisomere als auch deren Gemische.

Die Stereoisomerengemische können, falls erforderlich, in bekannter Weise in die stereoisomer einheitlichen Bestandteile getrennt werden, beispielsweise durch Chromatographie oder durch Kristallisationsverfahren.

Die Aminosäurereste können jeweils in der D-Form oder in der L-Form vorliegen.

- 5 Die Nomenklatur der Aminosäuren folgt den von der IUPAC aufgestellten Regeln. Bei fehlender Angabe der Stereochemie wurden Aminosäuren der L-Form eingesetzt.

- 10 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können bedingt durch eine Rotationshinderung in rotationsisomeren Formen oder als deren Gemische auftreten. Die Erfindung betrifft sowohl die reinen Rotationsisomere als auch deren Gemische.

- 15 Rotationsisomerengemische können gegebenenfalls, falls erforderlich, mittels bekannter Methoden in die einheitlichen Bestandteile getrennt werden, beispielsweise durch Chromatographie (z.B. HPLC) oder durch Kristallisationsverfahren. Möglich ist dies nicht nur auf der Endstufe der Konjugate, sondern gegebenenfalls auch auf Zwischenstufen. Aus den rotamerenreinen Zwischenstufen können gegebenenfalls durch geeignete Syntheseführung die rotamerenreinen Endstufen hergestellt werden.

- 20 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Form ihrer Salze vorliegen. Im allgemeinen seien hier Salze mit organischen oder anorganischen Basen oder Säuren sowie innere Salze genannt.

- 25 Zu den Säuren, die addiert werden können, gehören vorzugsweise Halogenwasserstoffsäuren, wie z.B. die Chlorwasserstoffsäure und die Bromwasserstoffsäure, insbesondere die Chlorwasserstoffsäure, ferner Phosphorsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, mono- und bifunktionelle Carbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren, wie z.B. Essigsäure, Trifluoressigsäure, Maleinsäure, Malonsäure, Oxalsäure, Gluconsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Salizylsäure, Sorbinsäure und Milchsäure sowie Sulfonsäuren, wie z.B. p-Toluolsulfonsäure, 1,5-Naphthalin-disulfonsäure oder Camphersulfonsäure.

- 30 Physiologisch unbedenkliche Salze können ebenso Metall- oder Ammoniumsalze solcher erfindungsgemäßen Verbindungen sein, die eine freie Carboxylgruppe

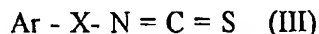
- besitzen. Besonders bevorzugt sind z.B. Natrium-, Kalium-, Magnesium- oder Calciumsalze, sowie Ammoniumsalze, die abgeleitet sind von Ammoniak oder organischen Aminen wie beispielsweise Ethylamin, Di- bzw. Triethylamin, Di- bzw. Triethanolamin, Dicyclohexylamin, Dimethylaminoethanol, Arginin, Lysin, Ethylendiamin oder Phenethylamin.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

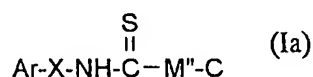


- 10 worin C die oben angegebene Bedeutung hat und M' für einen Rest M steht, der an den gewünschten Verknüpfungsstellen Wasserstoffatome trägt und dessen übrige potentielle Verknüpfungsstellen durch Schutzgruppen blockiert sind,

mit Verbindungen der allgemeinen Formel (III)



- 15 in geeigneten Lösemitteln in Gegenwart einer Base zu Verbindungen der allgemeinen Formel (Ia)



umsetzt,

- 20 worin Ar, X und C die oben angegebenen Bedeutungen haben und M'' für einen Rest M steht, dessen weitere potentielle Verknüpfungsstellen durch Schutzgruppen blockiert sind,

und im Fall der Einführung weiterer Gruppen $Ar-X-NH-\overset{\overset{S}{\parallel}}{C}-$,

die sich von der bzw. den zunächst eingeführten unterscheiden, die entsprechenden Schutzgruppen gegebenenfalls selektiv von den Verbindungen der Formel (Ia)

abspaltet, diese in der oben angegebenen Weise mit weiteren Verbindungen der allgemeinen Formel (III), die sich von den zunächst eingeführten unterscheiden, umsetzt und gegebenenfalls diese Reaktionssequenz zu Einführung weiterer von

den eingeführten Resten verschiedener Reste $\text{Ar-X-NH-C} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \end{array} \text{---}$ wiederholt,

5 und daß man verbleibende Schutzgruppen gegebenenfalls abspaltet.

Die erfindungsgemäßen Konjugate können beispielsweise hergestellt werden durch Verknüpfung von Hydroxy- oder Aminogruppen tragenden Cytostatika-Derivaten (z.B. Batracylin, Chinolone oder Camptothecine) mit aktivierten Carboxylkomponenten, die ihrerseits Teile von geschützten Aminosäuren, Peptiden oder
10 N-thiocarbonyl-modifizierten Peptiden darstellen können.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (II) sind zugänglich, indem man nach üblichen Methoden der Peptidchemie gegebenenfalls geschützte Aminosäurebausteine an Amino- oder Hydroxyfunktionen von C anknüpft und gegebenenfalls durch schrittweise Einführung weiterer Aminosäurebausteine eine Peptidkette auf-
15 baut. Alternativ können auch gegebenenfalls Schutzgruppen tragende Peptid-Bausteine nach üblichen Methoden mit C verknüpft werden.

Die Reaktionen können bei verschiedenen Druck- und Temperaturverhältnissen, beispielsweise 0,5 bis 2 bar, bzw. -30 bis +100°C, in geeigneten Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan, Chloroform, niederen Alkoholen, Acetonitril, Dioxan, Wasser oder in Gemischen der ge-
20 nannten Lösungsmittel durchgeführt werden. In der Regel sind Reaktionen in DMF oder THF/Dichlormethan bei Normaldruck und bei einer Temperatur von 0 bis 60°C, insbesondere bei etwa Raumtemperatur, bevorzugt.

Für die Aktivierung der Carboxylgruppen kommen die in der Peptidchemie be-
25 kannten Kupplungsreagenzien wie sie z.B. in Jakubke/Jeschkeit: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verlag Chemie 1982 oder Tetrahedr. Lett. 34, 6705 (1993) beschrieben sind, in Frage. Bevorzugt sind beispielsweise Säurechloride, N-Carbonsäureanhydride oder gemischte Anhydride.

Weiterhin bevorzugt zur Aktivierung der Carboxylgruppen ist die Bildung von
30 Addukten mit Carbodiimiden z.B. N,N'-Diethyl-, N,N'-Diisopropyl-, N,N'-Dicyclo-

hexylcarbodiimid, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid, N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat, oder Carbonylverbindungen wie Carbonyldiimidazol, oder 1,2-Oxazoliumverbindungen wie 2-Ethyl-5-phenyl-1,2-oxazolium-3-sulfat oder 2-tert-Butyl-5-methyl-isoxazolium-perchlorat, oder Acylaminoverbindungen wie 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, oder Propanphosphonsäureanhydrid, oder Isobutylchloroform, oder Benzotriazolyloxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat, 1-Hydroxybenzotriazol oder Hydroxysuccinimidester.

Als Basen können beispielsweise Triethylamin, Hünig-Base, Ethyl-diisopropylamin, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin oder andere eingesetzt werden.

Als Schutzgruppen für eventuelle weitere reaktive Funktionen im Cytostatikum-Teil oder für Drittfunktionen der Aminosäuren können die in der Peptidchemie bekannten Schutzgruppen beispielsweise vom Urethan-, Alkyl-, Acyl-, Ester- oder Amid-Typ eingesetzt werden.

Aminoschutzgruppen im Rahmen der Erfindung sind die üblichen in der Peptid-Chemie verwendeten Aminoschutzgruppen.

Hierzu gehören bevorzugt: Benzyloxycarbonyl, (Cbz) 3,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 2,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 4-Methoxybenzyloxycarbonyl, 4-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitro-4,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, tert.-Butoxycarbonyl, (Boc) Allyloxycarbonyl, Vinyloxycarbonyl, 3,4,5-Trimethoxybenzyloxycarbonyl, Phthaloyl, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, 2,2,2-Trichlor-tert-butoxycarbonyl, Menthylloxycarbonyl, 4-Nitrophenoxycarbonyl, Fluorenyl-9-methoxycarbonyl (Fmoc), Formyl, Acetyl, Propionyl, Pivaloyl, 2-Chloracetyl, 2-Bromacetyl, 2,2,2-Trifluoracetyl, 2,2,2-Trichloracetyl, Benzoyl, Benzyl, 4-Chlorbenzoyl, 4-Brombenzoyl, 4-Nitrobenzoyl, Phthalimido, Isovaleroyl oder Benzyloxymethylen, 4-Nitrobenzyl, 2,4-Dinitrobenzyl, 4-Nitrophenyl oder 2-Nitrophenylsulfenyl. Besonders bevorzugte Schutzgruppen sind Fmoc, Boc und Cbz.

Die Abspaltung von Schutzgruppen in den entsprechenden Reaktionsschritten kann zum Beispiel durch Säure- oder Baseneinwirkung, hydrogenolytisch oder auf andere Weise reduktiv erfolgen.

Biologische Testung**1. Wachstumsinhibitionstest zur Bestimmung der cytotoxischen Eigenschaften**

Die humanen Dickdarmtumorzelllinien SW 480 und HT 29 (ATCC-Nr. CCL 228 und HBT-38) sowie die Maus-Melanom-Zelllinie B16F10 wurden in Rouxschalen in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FCS gezogen. Anschließend wurde trypsinisiert und in RPMI plus 10 % FCS zu einer Zellzahl von 50.000 Zellen/ml aufgenommen. 100 µl Zellsuspension/Well wurden in eine 96 Mikrowellplatte gegeben und 1 Tag bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 µl RPMI Medium und 1 µl DMSO mit den Prüfsubstanzen zugesetzt. Das Wachstum wurde nach Tag 3 und Tag 6 überprüft. Dazu wurde zu jedem Mikrowell 40 µl MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolinbromid) mit einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml H₂O zugesetzt. Es wurde 5 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 100 µl i-Propanol/Well zugesetzt. Nach 30 min. Schütteln mit 100 µl H₂O wurde die Extinktion bei 540 nm mit einem Titertek Multiskan MCC/340 (Flow) gemessen.

Die cytotoxische Wirkung ist in der Tabelle 1 als IC₅₀-Wert jeweils für die SW 480- und HT 29- und B16F10-Zelllinie angegeben:

Tabelle 1:

Beispiel	IC ₅₀ / µM SW 480	IC ₅₀ / µM HT 29	IC ₅₀ / µM B16F10
1.2)	25	40	-
1.3)	45	70	-
1.4)	40	40	30
1.5)	250	400	-
1.6)	550	800	-

Beispiel	IC ₅₀ / μ M SW 480	IC ₅₀ / μ M HT 29	IC ₅₀ / μ M B16F10
2.1)	20	9	9
2.2)	15	6	4
2.3)	0,9	0,7	0,2
2.4)	0,8	0,9	1
2.5)	200	> 200	200
2.6)	0,2	0,3	0,06
2.8)	0,2	0,1	0,1
2.9)	2	2	1
2.10)	2	2	0,4
2.11)	60	150	30
3)	3	2	1
4.1)	0,01	0,02	0,1
4.2)	0,07	0,06	0,3
4.3)	0,02	0,02	0,1
4.4)	0,3	0,2	0,6
4.5)	0,3	0,2	0,8
4.6)	0,2	0,15	0,5
4.7)	0,1	0,06	0,3
4.8)	0,3	0,15	0,8
4.9)	0,02	0,015	0,2
4.10)	0,02	0,01	0,2
4.11)	0,06	0,03	0,2
4.12)	0,04	0,03	0,2
4.13)	0,06	0,04	0,2
4.14)	0,16	0,075	0,75

Beispiel	IC ₅₀ / μ M SW 480	IC ₅₀ / μ M HT 29	IC ₅₀ / μ M B16F10
4.15)	0,09	0,06	0,2
4.16)	0,15	0,12	0,6
4.17)	0,3	0,17	0,8
4.18)	0,3	0,12	0,4
4.19)	0,08	0,04	0,4
4.20)	0,07	0,06	0,3
4.21)	0,7	0,3	3
4.22)	0,04	0,04	0,1
4.23)	0,08	0,07	0,15
5.1)	0,025	0,02	0,05
5.2)	0,5	0,3	0,9
6)	0,005	0,003	0,015
7)	0,06	0,08	1
8)	0,15	0,2	3,0

2. Hämatopoetische Aktivität von Konjugaten im Vergleich zum zugrundeliegenden Wirkstoff

Material und Methoden:

- 5 Knochenmarkszellen wurden aus dem Femur der Maus gespült. 10^5 -Zellen werden in McCoy 5A-Medium (0,3 % Agar) zusammen mit rekombinanten murinen GM-CSF (Genzyme; Stammzellen-Kolonienbildung) und den Substanzen (10^{-4} bis 100 $\mu\text{g/ml}$) bei 37 °C und 7 % CO_2 inkubiert. 7 Tage später wurden die Kolonien (<50 Zellen) und Kluster (17-50 Zellen) ausgezählt.

Ergebnisse:

- 10 Wie in Tabelle 2 dargestellt zeigen die untersuchten Konjugate eine gegenüber dem zugrundeliegenden Wirkstoff eine drastisch verminderte Hemmung der Knochenmarkstammzellproliferation.

Tabelle 2: Hemmung der CSF-induzierten Proliferation von Knochenmarkstammzellen der Maus

15

Beispiel	IC_{50} [ng/ml]
Chinolon-a	0,2
2.4)	60,0
Camptothecin	0,4
4.4)	10
4.9)	22

20

3. In-vivo-Hemmung des Tumorwachstums im Nacktmaus-Modell

Material:

- 25 Für alle in-vivo-Experimente zur Untersuchung der Hemmung des Tumorwachstums wurden athymische Nacktmäuse (NMRI nu/nu-Stamm) verwendet. Das ausgewählte großzellige Lungenkarzinom LXFL 529 wurde durch serielle Passage in

Nacktmäusen entwickelt. Der menschliche Ursprung des Tumors wurde durch isoenzymatische und immunohistochemische Methoden belegt.

Experimenteller Aufbau:

- Der Tumor wurde subcutan in beide Flanken von 6 bis 8 Wochen alten nu/nu-Nacktmäusen implantiert. Die Behandlung wurde, abhängig von der Verdopplungszeit, gestartet sobald die Tumoren einen Durchmesser von 5-7 mm erreicht hatten. Die Mäuse wurden der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (5 Mäuse pro Gruppe mit 8-10 auswertbaren Tumoren) durch Randomisieren zugeteilt. Die einzelnen Tumoren der Kontrollgruppe wuchsen alle progressiv.
- 5
- 10 Die Größe der Tumoren wurde in zwei Dimensionen mittels Schieblehre vermessen. Das Tumolvolumen, das gut mit der Zellzahl korreliert, wurde anschließend für alle Auswertungen verwendet. Das Volumen wurde gemäß der Formel "Länge x Breite x Breite / 2" berechnet ($[a \times b^2] / 2$, a bzw. b stehen für zwei rechtwinklig angeordnete Durchmesser).
- 15 Die Werte des relativen Tumolvolumens (RTV) wurden für jeden einzelnen Tumor durch Dividieren der Tumorgröße am Tag X mit der Tumorgröße des Tages 0 (zum Zeitpunkt der Randomisierung) berechnet. Die mittleren Werte des RTV wurden dann für die weitere Auswertung verwendet.
- 20 Die Hemmung der Zunahme des Tumolvolumens (Tumolvolumen der Testgruppe / Kontrollgruppe, T/C, in Prozent) war der abschließende Meßwert.

Behandlung:

Die Applikation der Verbindungen erfolgte an Tag 1, 2 und 3 nach Randomisierung intraperitoneal (i.p.).

Ergebnisse:

- 25 Anhand der Verbindung aus Beispiel 4.4) ist die therapeutische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate gegenüber dem großzelligen humanen Lungentumorxenografts LXFL 529 dargestellt. Die Therapie führt bei der maximal tolerablen Dosis (MTD) und bei der Hälfte der MTD zu Tumorremissionen.

Tabelle 3:

Therapie	Dosis [mg/kg/Tag]	Überlebens- zeit [Tage]	Zahl der Tumore [Tag 21]	relatives Tumorzvolumen an Tag 21 [% des Tags 0]	relatives Körpergewicht an Tag 21 [% des Tags 0]
Kontroll- gruppe	-	>39 35 35 >18 >35	16	1137	111,6
Beispiel 4.4)	6,25 (MTD)	7 >43 >43 >43 >43	9	0,2	113,0
Beispiel 4.4)	3,125	>43 >43 >43 >43	7	69,5	105,8

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen sowohl in-vitro als auch in-vivo eine überraschen starke cytotoxische Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumoren, insbesondere solchen der Lunge und des Dickdarms, verbunden mit einer großen Selektivität gegenüber nicht malignen Zellen auf.

Sie eignen sich daher zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere von solchen der Lunge und des Dickdarms.

Zur vorliegenden Erfindung gehören pharmazeutische Zubereitungen, die neben nicht-toxischen, inerten pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen eine oder mehrere erfindungsgemäße Verbindungen enthalten oder die aus einem oder mehreren erfindungsgemäßen Wirkstoffen bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitungen.

Der oder die Wirkstoffe können gegebenenfalls in einem oder mehreren der oben angegebenen Trägerstoffe auch in mikroverkapselter Form vorliegen.

Die therapeutisch wirksamen Verbindungen sollen in den oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 99,5, vorzugsweise von etwa 0,5 bis 95 Gew.-%, der Gesamtmischung vorhanden sein.

Die oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können außer den erfindungsgemäßen Verbindungen auch weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

- 5 Im allgemeinen hat es sich sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als vorteilhaft erwiesen, den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe in Gesamtmengen von etwa 0,5 bis etwa 500, vorzugsweise 5 bis 100 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben, zur Erzielung der gewünschten Ergebnisse zu verabreichen. Eine Einzelgabe enthält den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe vorzugsweise in Mengen von etwa 1 bis etwa 80, insbesondere 3 bis 30mg/kg Körpergewicht.

10

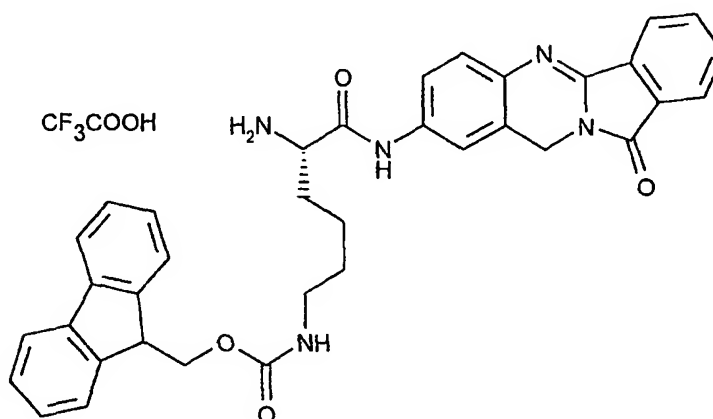
Synthesebeispiele

Alle Thiocarbonyl-Aminosäure- bzw. Thiocarbonyl-Peptidkonjugate, die Gegenstand dieser Erfindung sind, werden nach der folgenden allgemeinen Vorschrift synthetisiert:

- 15 Eine Lösung von 1 mmol des zugrundeliegenden Aminosäure- bzw. Peptidkonjugats in 50 ml absolutem Dimethylformamid wird mit je 1,1 mmol des entsprechenden Isothiocyanats pro freier Aminogruppe versetzt. Nach Zugabe von 1,74 ml (10 mmol) Ethyldiisopropylamin wird der Ansatz bei Raumtemperatur gerührt bis sich im Dünnschichtchromatogramm kein Aminosäure- bzw. Peptidkonjugat mehr nachweisen läßt, längstens jedoch 16 h. Man engt i. Vak. ein und
20 reinigt den Rückstand nach Trocknung i. Hochvak. durch Flash-Chromatographie an Kieselgel z.B. mit einem Ethylacetat / Petrolether- oder einem Dichlormethan / Methanol-System. Auch mehrmaliges Umfällen aus Dichlormethan / Methanol 1:1 (v/v) mit Diethylether ergibt vielfach reine Produkte.

- 25 Verbleibende Schutzgruppen werden anschließend in einer zweiten Stufe nach literaturbekannten Verfahren entfernt (eine Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-Gruppe z.B. mit Piperidin in absolutem Dimethylformamid bei Raumtemperatur; eine tert-Butoxycarbonyl-Gruppe z.B. mit Trifluoressigsäure in absolutem Dichlormethan bei Raumtemperatur).

- 30 Die entsprechenden Isothiocyanate sind im Chemikalienfachhandel zu erwerben oder werden nach literaturbekannten Methoden synthetisiert.

Synthesebeispiele Vorstufen: Aminosäure- bzw. PeptidkonjugateBeispiel I.1**N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-batracylin, Trifluoracetat**

5 **I.1.a) N-[N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]- batracylin:**

N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysine (5,3 g, 11,3 mmol) und 2-Isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydro-chinolin (4 ml, 14 mmol) werden in 40 ml Dichlormethan gelöst. Nach 20 min. Rühren bei Raumtemperatur setzt man eine Lösung von Batracylin (2,5 g, 10 mmol) in Dimethylformamid (80 ml) zu und rührt den Ansatz für weitere 24 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird im Vakuum eingeeengt bis Kristallisation einsetzt. Die erhaltene Suspension wird mit Ethanol (500 ml) versetzt und für 1 h unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird das Produkt abfiltriert und mit Aceton und dann mit Diethylether gewaschen. Man erhält gelbe Kristalle

10

15

I.1) N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-batracylin, Trifluoracetat:

Eine Suspension der obigen Verbindung (5,6 g, 8 mmol) in Dichlormethan (75 ml)

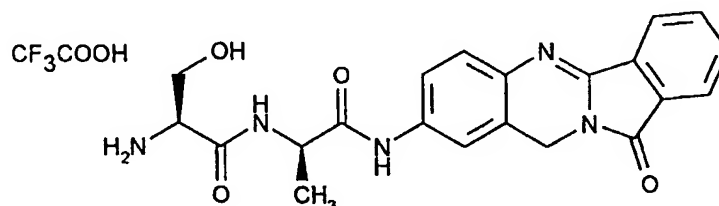
20

wird mit wasserfreier Trifluoressigsäure (25 ml) versetzt und die resultierende

- Lösung für 90 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Vakuum wird der Rückstand durch Zugabe von Diethylether (200 ml) kristallisiert. Der Niederschlag wird abfiltriert und intensiv mit Diethylether gewaschen. Nach mehrmaligem Umfällen aus Dichlormethan/Methanol 1:1 mit Diethylether erhält man
- 5 gelb-orange Kristalle (5,13 g, 90 %) [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,05$; Schmp. = 162 °C (Zers.)].

Beispiel I.2

N-[Seryl-D-alanyl]-batracylin, Trifluoracetat



10 I.2.a) N-[N-Benzoyloxycarbonyl-D-alanyl]-batracylin:

- N-Benzoyloxycarbonyl-D-alanine (3,9 g, 17,5 mmol) wird in Analogie zu Beispiel I.1.a mit Batracylin (4,1 g, 16,4 mmol) umgesetzt. Nach Einengen im Vakuum auf 50 ml wird mit Ethylacetat auf 300 ml aufgefüllt und sofort für 10 min. zum Sieden erhitzt. Anschließend läßt man auf Raumtemperatur abkühlen, filtriert ab
- 15 und kocht das Filtergut erneut mit Ethylacetat (200 ml) aus. Abkühlung unter Rühren auf 0 °C und Filtration ergibt gelbe Kristalle. Die Kristalle (6,4 g, 80 %) werden durch Filtration abgetrennt und die vereinigten Filtrate nach Einengen im Vakuum durch Flashchromatographie [Petrolether/Ethylacetat 3:2 → 1:1] gereinigt. Man erhält weitere 1,35 g (17 %) [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,45$; Schmp. = 256 °C;
- 20 $[\alpha]^{20} = +75,1^\circ$ ($c = 1,0$ / $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 0,5\% \text{CH}_3\text{OH}$)].

I.2.b) N-[D-Alanyl]-batracylin:

- Verbindung I.2.a (11,4 g, 25 mmol) wird in einer 33%-igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig (100 ml) gelöst. Nach 30 min. bei Raumtemperatur wird der Ansatz im Vakuum auf 30 ml eingengt und anschließend unter kräftigem
- 25 Rühren in gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1000 ml) gegossen. Man

rührt für 10 min. weiter, filtriert ab und wäscht mit Wasser, wenig Isopropanol und Diethylether. Das Produkt fällt in gelben Kristallen (7,87 g, 98 %) an [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,06$; Schmp. = 267 °C (Zers.)].

I.2.c) N-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-seryl-D-alanyl]-batracylin:

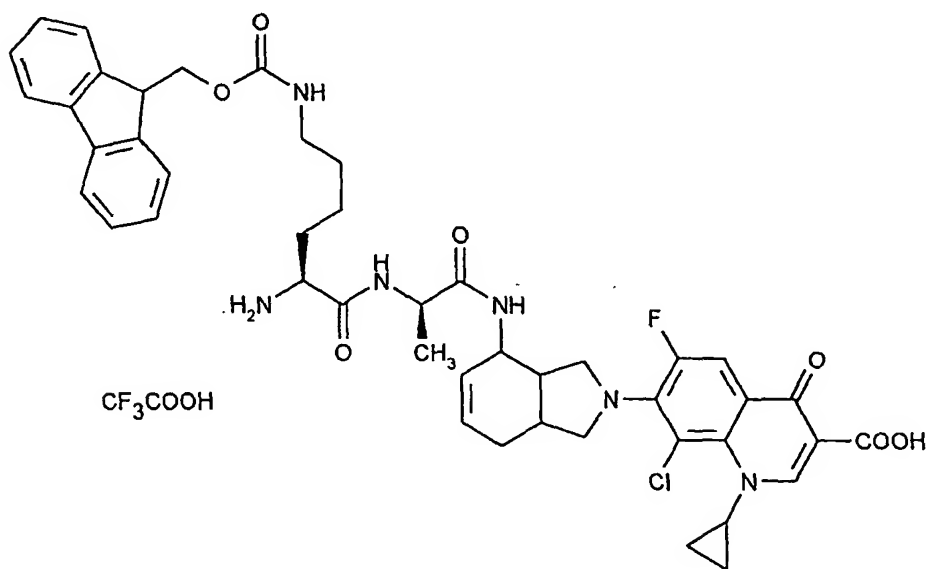
- 5 Darstellung in Analogie zu Beispiel I.1.a aus N-(tert-Butoxycarbonyl)-serin und N-[D-Alanyl]-batracylin (Beispiel I.2.b); Ausb.: 77 %.

I.2) N-[Seryl-D-alanyl]-batracylin, Trifluoracetat:

Darstellung in Analogie zu Beispiel I.1 aus Verbindung I.2.c; Ausb.: 98 %.

Beispiel I.3

- 10 N-[N^c-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-chinolon-a,
Trifluoracetat



I.3.a) N-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-D-alanyl]-chinolon-a:

N-(tert-Butoxycarbonyl)-D-alanin (3,6 g, 19,2 mmol) und 2-Isobutoxy-1-isobutoxycarbonyl-1,2-dihydro-chinolin (5,8 g, 19,2 mmol) werden in 200 ml Dimethylformamid gelöst. Nach 8 h Rühren bei Raumtemperatur setzt man Chinolon-a (4 g, 9,6 mmol) und Ethyldiisopropylamin (3,3 ml) zu und behandelt den Ansatz 10 h mit Ultraschall. Man engt ein, nimmt den Rückstand in Dichlormethan auf und fällt mit Ether. Nach Filtration, Waschen mit Ether und Trocknen im Hochvakuum erhält man 4,58 g (81 %) vom Zielprodukt, welches ohne weitere Reinigung umgesetzt wird.

10 I.3.b) N-[D-Alanyl]-chinolon-a, Trifluoracetat:

4,56 g (7,75 mmol) der Verbindung aus obigem Beispiel werden in einer Mischung aus Dichlormethan (50 ml) und wasserfreier Trifluoressigsäure (50 ml) bei 0 °C gelöst und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Man engt ein, destilliert mit Dichlormethan nach und fällt den Rückstand aus Methanol mit Diethylether um. Man erhält 4,07 g (87 %) des kristallinen Zielproduktes [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): $R_f = 0,34$].

I.3.c) N-[N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-chinolon-a:

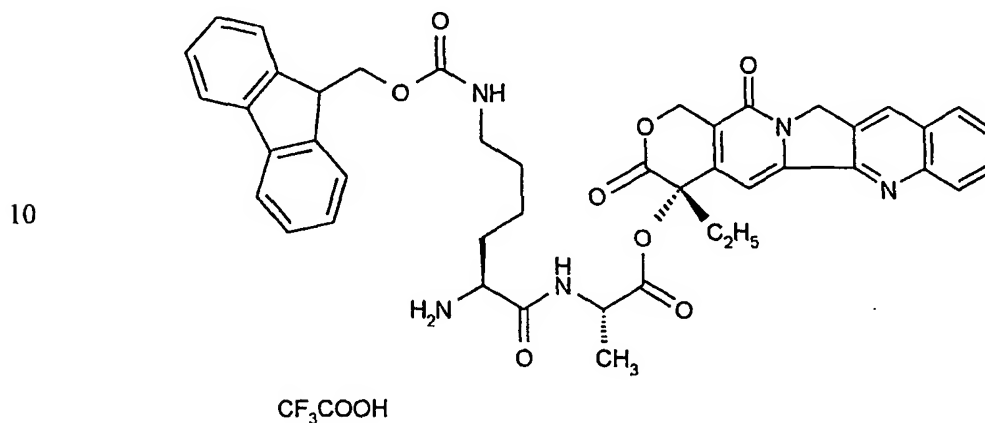
N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysin (1,57 g, 3,36 mmol) wird in Dimethylformamid (25 ml) gelöst und bei 0 °C mit N-Hydroxysuccinimid (600 mg, 5,04 mmol) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (820 mg, 4,03 mmol) versetzt. Nach 3 h filtriert man den entstandenen Harnstoff ab, gibt zum Filtrat 1,5 g (2,86 mmol) der Verbindung aus Beispiel I.3.b) und rührt 16 h bei Raumtemperatur. Restlicher Harnstoff wird abfiltriert und das Filtrat durch Flash-Chromatographie [Dichlormethan/Methanol 97,5:2,5 → 90:10] gereinigt. Anschließend fällt man aus Dichlormethan/Methanol 1:1 mit Diethylether um. Ausb.: 1,5 g (56 %) [DC (Dichlormethan/Methanol 9:1): $R_f = 0,47$].

**1.3) N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-
chinolon-a, Trifluoracetat**

5 Abspaltung der tert-Butoxycarbonyl-Gruppe aus Verbindung 1.3.c in Analogie zu
Beispiel 1.1 und Umfällung des Rohproduktes aus Methanol mit Diethylether
ergibt gelbe Kristalle. Ausb.: 80 % [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak
(17 %ig) 15:4:0,5): R_F = 0,36].

Beispiel 1.4

**20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin,
Trifluoracetat**



1.4.a) 20-O-(Alanyl)-camptothecin, Trifluoracetat:

Camptothecin (500 mg, 1,44 mmol) werden in absolutem Dimethylformamid
(20ml) gelöst und dann mit 4-Dimethylaminopyridin (50 mg) und N-tert-Butoxy-
carbonyl-alanin-N-carboxy-anhydrid (775 mg, 3,6 mmol) versetzt. Nach 3 h
15 werden weitere 775 mg (3,6 mmol) N-tert-Butoxycarbonyl-alanin-N-carboxy-
anhydrid zugegeben und die Suspension 16 h mit Ultraschall behandelt. Man engt
ein, nimmt das Rohmaterial in Dichlormethan (50 ml) auf und gibt bei 0 °C 5 ml
Trifluoressigsäure zu. Nach 30 min. Rühren wird erneut eingengt und das Produkt
20 durch Flash-Chromatographie gereinigt (Acetonitril/Wasser 20:1). Die entsprechen-
den Fraktionen werden gesammelt, eingengt und nach Lösen in Dioxan/Wasser

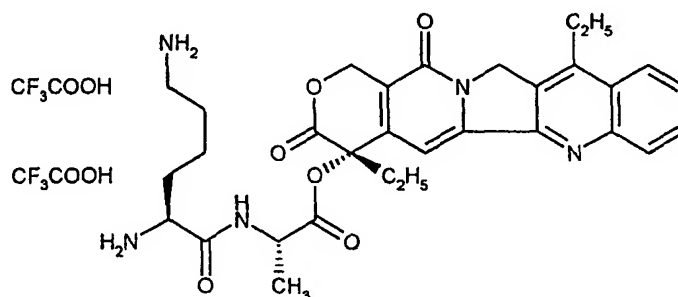
lyophilisiert. Man erhält 712 mg (93 %) der Zielverbindung [FAB-MS: $m/z = 420$ ($M+H$)⁺].

I.4) 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin, Trifluoracetat:

- 5 Das Konjugat aus Beispiel I.4.a wird nach Standard-Vorschrift (siehe Beispiel I.1.a) mit N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysin verknüpft und anschließend in Analogie zu Beispiel I.1 an der α-Aminofunktion deblockiert. Man erhält die Zielverbindung in einer Ausbeute von 24% [DC (Acetonitril/Wasser 20:1): R_f = 0,15].

10 **Beispiel I.5**

7-Ethyl-20-O-(lysyl-alanyl)-camptothecin, Di-Trifluoracetat



I.5.a) 7-Ethyl-20-O-[N-(tert-butoxycarbonyl)-alanyl]-camptothecin:

- 15 Eine Lösung von 1,88 g (5,0 mmol) 20(S)-7-Ethyl-camptothecin (S. Sawada et al., Chem.Pharm.Bull. 39 (1991) 1446-1454) in 100 ml absolutem Dimethylformamid wird unter Rühren mit 2,15 g (10,0 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-alanin-N-carbonsäureanhydrid sowie 150 mg (1,2 mmol) 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin versetzt. Nach 3 h bei Raumtemperatur setzt man weitere 2,15 g (10,0 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-alanin-N-carbonsäureanhydrid und 150 mg (1,2 mmol)
- 20 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin zu und rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wird im Vakuum eingengt und der Rückstand durch Flash-chromatographie [Petrolether/Ethylacetat 2:1 → 1:1 → Ethylacetat] gereinigt. Man

erhält 2,02 g (73,8 %) an farblosen Kristallen [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,56$; Schmp. = 206-212°C; FAB-MS: $m/z = 548$ ($M+H^+$)].

1.5.b) 20-O-Alanyl-7-ethyl-camptothecin, Trifluoracetat:

5 Eine Lösung von Verbindung 1.5.a (1,81 g, 3,3 mmol) in einer Mischung aus 70 ml Dichlormethan und 7 ml wasserfreier Trifluoressigsäure wird für 90 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Vakuum auf ein kleines Volumen wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt und gründlich mit Diethylether gewaschen. Man erhält 1,34 g (72,3 %) an hellgelben Kristallen [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,05$; Schmp. = 242°C (Zers.)].

10 **1.5.c) 7-Ethyl-20-O-[N^α,N^ε-di-(tert-butoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin:**

1,57 g (4,55 mmol) N,N-Di-(tert-butoxycarbonyl)-lysin und 923 mg (6,83 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat werden in 35 ml Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 1,09 g (5,7 mmol) N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid und 990 µl (5,7 mmol) Ethyl-diisopropylamin rührt man für 15 30 min. bei Raumtemperatur. Anschließend setzt man eine Lösung aus Verbindung 1.5.b (1,3 g, 2,32 mmol) in 35 ml Dimethylformamid und 408 µl (2,32 mmol) Ethyl-diisopropylamin zu und rührt den Ansatz für weitere 16 h bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum und Reinigung durch Flashchromatographie [Petrolether/Ethylacetat 2:1 → 1:1 → Ethylacetat] erhält man hellgelbe 20 Kristalle. Ausb.: 1,38 g (75,3 %) [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,53$; Schmp. = 125°C (Zers.)].

1.5) 7-Ethyl-20-O-(lysyl-alanyl)-camptothecin, Di-Trifluoracetat:

25 Eine Suspension der obigen Verbindung (1,18 g, 1,5 mmol) in Dichlormethan (50 ml) wird mit wasserfreier Trifluoressigsäure (5 ml) versetzt und die resultierende Lösung für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen auf ein kleines Volumen im Vakuum wird das Produkt durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und aus Ethylacetat umkristallisiert. Man erhält 862 mg (71,5 %) an gelben Kristallen [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,05$; Schmp. = 30 137°C (Zers.)].

Beispiel I.6:

7- $\{N^{\epsilon}$ -[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L-valyloxymethyl}-camptothecin,
Trifluoracetat

I.6.a) 7-Hydroxymethyl-camptothecin:

- 5 Diese Verbindung wird nach der Vorschrift von Miyasaka et al. (Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 2574) hergestellt.

I.6.b) 7-L-Valyloxymethyl)-camptothecin, Trifluoracetat:

- 10 1 g (2,64 mmol) 7-Hydroxymethyl-camptothecin werden in 100 ml DMF gelöst und dann mit 100 mg 4-N,N-Dimethylaminopyridin und einem Äquivalent N-tert-Butoxycarbonyl-L-valin-N-carboxy-anhydrid versetzt und die Suspension 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Man engt ein und reinigt durch Flash-Chromatographie an Ethylacetat/Petrolether 1:1 und später 1,5:1. Das gereinigte Material wird in 30 ml Dichlormethan aufgenommen und bei 0°C mit 5 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 30 min Rühren wird eingengt und das aminodeblockierte Produkt aus
15 Dichlormethan/Ether gefällt. Man erhält die Zielverbindung in einer Gesamtausbeute von 55 %. [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2) R_f = 0,37]

I.6 7- $\{N^{\epsilon}$ -[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L-valyloxymethyl}-camptothecin, Trifluoracetat

- 20 560 mg des Konjugats aus Beispiel I.6.b werden zu einer Lösung aus 560 mg (1,5 Äq.) N^{α} , N^{ϵ} -bis-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin, 239 mg N-Hydroxybenzotriazol und 271 mg N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid in 50 ml Dimethylformamid gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man engt ein, nimmt in Dichlormethan auf und extrahiert dreimal mit Wasser. Nach Trocknen der organischen Phase wird eingengt und durch
25 Flashchromatographie (Petrolether/Essigester 1:1 \geq Essigester) gereinigt.

Anschließend wird das erhaltene Produkt in 20 ml Dichlormethan aufgenommen, bei 0°C mit 3 ml Trifluoressigsäure versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen und Fällern aus Dichlormethan/Ether erhält man die

Zielverbindung in 62-%iger Ausbeute. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R_f = 0,62]

I.7 10,11-Methylendioxy-20-O-{N^ε-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-lysyl-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat

5 I.7.a) 10,11-Methylendioxy-camptothecin:

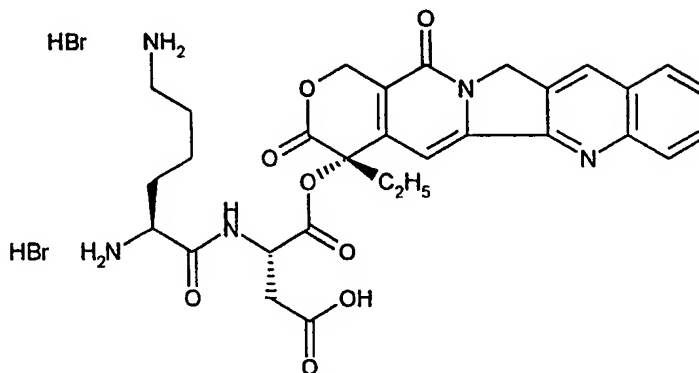
Dieses Camptothecin-Derivat wird nach Wall et al. (J. Med. Chem. 29 (1986), 2358) aus dem S-konfigurierten, enantiomerenreinen Tricyclus, der z.B. durch Racematspaltung gewonnen werden kann, hergestellt.

I.7.b) 10,11-(Methylendioxy)-20-O-leucyl-camptothecin, Trifluoracetat

- 10 150 mg (0,382 mmol) 10,11-Methylendioxy-camptothecin werden in 20 ml DMF gelöst und dann mit 20 mg 4-N,N-Dimethylaminopyridin und 10 Äquivalenten N-tert.-Butoxycarbonyl-L-leucin-N-carboxy-anhydrid versetzt und die Suspension 16 h bei 40°C gerührt. Man engt ein und reinigt durch Flash-Chromatographie an Ethylacetat/Petrolether 2:1. Das gereinigte Material wird in 15 ml Dichlormethan
- 15 aufgenommen und bei 0°C mit 2 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 30 min Rühren wird eingeengt und das aminodeblockierte Produkt aus Dichlormethan/Methanol mit Ether gefällt. Man erhält die Zielverbindung in einer Gesamtausbeute von 35 %.

20 I.7.c) 10,11-Methylendioxy-20-O-{N^ε-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-lysyl-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat

- Das Konjugat aus Beispiel I.7.b wird nach Standardvorschrift (siehe Beispiel I.1.a mit N^α-(tert.-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysin verknüpft und anschließend an der α-Aminofunktion durch Einwirkung von Trifluoressigsäure deblockiert. Ausb.: 69 % über 2 Stufen. [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 R_f =
- 25 0,4].

Beispiel 1.8**20-O-(Lysyl-aspartyl)-camptothecin, Di-Hydrobromid****I.8.a) 20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-aspartyl-(γ-benzylester)]-camptothecin:**

- 5 Eine Suspension von 5,23 g (15,0 mmol) 20(S)-Camptothecin in 400 ml absolutem Dimethylformamid wird unter Rühren mit 10,45 g (30,0 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-asparaginsäure-(γ-benzylester)-N-carbonsäureanhydrid sowie 367 mg (3,0 mmol) 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin versetzt. Nach 8 h Rühren bei 60 °C setzt man weitere 5,23 g (15,0 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-asparaginsäure-(γ-benzylester)-N-carbonsäureanhydrid und 183,5 mg (1,5 mmol) 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin zu und rührt für drei Tage bei Raumtemperatur. Anschließend wird
- 10 im Vakuum eingeeengt und der Rückstand durch Flashchromatographie [Petrol-ether/Ethylacetat 1:2] gereinigt. Man erhält 2,3 g (23,4 %) an orange-gelben Kristallen [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,59$; Schmp. = 130°C (Zers.)].

I.8.b) 20-O-Aspartyl-(γ-benzylester)-camptothecin, Trifluoracetat:

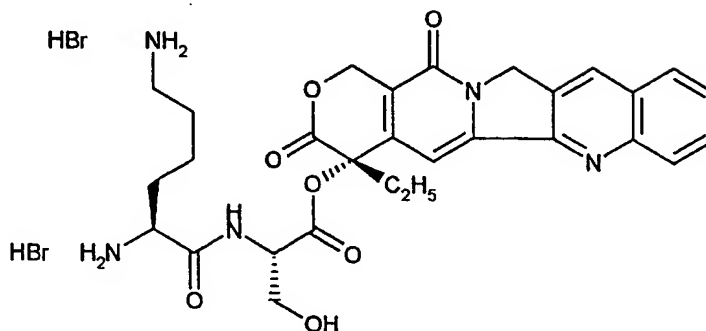
- Eine Lösung von Verbindung I.8.a (2,22 g, 3,4 mmol) in einer Mischung aus 70 ml Dichlormethan und 7 ml wasserfreier Trifluoressigsäure wird für 90 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Vakuum auf ein kleines Volumen wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt und gründlich mit Diethylether
- 20 gewaschen. Man erhält 1,08 g (72,3 %) an beigen Kristallen [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,14$; Schmp. = 216°C (Zers.)].

1.8.c) 20-O-[N^α,N^ε-di-(tert-Butoxycarbonyl)-lysyl-aspartyl-(γ-benzylester)]-camptothecin:

433 mg (1,25 mmol) N,N-Di-(tert-butoxycarbonyl)-lysin und 338 mg (2,50 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat werden in 15 ml Dimethylformamid gelöst.
5 Nach Zugabe von 360 mg (1,88 mmol) N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid und 500 µl (3,0 mmol) Ethyl-diisopropylamin rührt man für 15 min. bei Raumtemperatur. Anschließend setzt man eine Lösung aus Verbindung 1.8.b (500,7 mg, 0,75 mmol) in 15 ml Dimethylformamid und 200 µl (1,13 mmol) Ethyl-diisopropylamin zu und rührt den Ansatz für weitere 16 h bei Raum-
10 temperatur. Nach Einengen im Vakuum wird der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und die Lösung einmal mit Wasser gewaschen. Man trocknet über MgSO₄ und reinigt den nach Einengen im Vakuum verbleibenden Rückstand durch Flashchromatographie [Petrolether/Ethylacetat 1:2] zu beigen Kristallen. Ausb.: 473,8 mg (70,5 %) [DC (Ethylacetat): R_f = 0,42; Schmp. = 99°C (Zers.)].

15 1.8) 20-O-(Lysyl-aspartyl)-camptothecin, Di-Hydrobromid:

Eine Lösung der obigen Verbindung (462 mg, 0,52 mmol) in Dichlormethan (25 ml) wird mit einer 33%-igen Lösung von Bromwasserstoff in Essigsäure (5 ml) versetzt und die nach wenigen Minuten resultierende Suspension für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Man dekantiert von dem ausgefallenen Produkt ab und
20 wäscht den Rückstand gründlich mit Diethylether. Zur Reinigung wird nach Lösung in warmem Ethanol durch Zugabe von Diethylether umgefällt. Man erhält 391 mg (100 %) an gelben Kristallen [DC (Acetonitril/Wasser 5:1): R_f = 0,05; Schmp. = 225°C (Zers.)].

Beispiel 1.9**20-O-(Lysyl-seryl)-camptothecin, Di-Hydrobromid****1.9.a) 20-O-[O-Benzyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-seryl]-camptothecin:**

- 5 Eine Suspension von 5,23 g (15,0 mmol) 20(S)-Camptothecin in 400 ml absolutem Dimethylformamid wird unter Rühren mit 9,64 g (30,0 mmol) O-Benzyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-serin-N-carbonsäureanhydrid sowie 367 mg (3,0 mmol) 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin versetzt. Nach 8 h Rühren bei 60 °C setzt man weitere 4,82 g (15,0 mmol) O-Benzyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-serin-N-carbonsäureanhydrid
- 10 und 183,5 mg (1,5 mmol) 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin zu und rührt für drei Tage bei Raumtemperatur. Anschließend wird der Ansatz filtriert, das Filtrat im Vakuum eingeeengt und der Rückstand durch Flashchromatographie [Petrol-ether/Ethylacetat 2:1 → 1:1 → 1:2] gereinigt. Man erhält 6,66 g (70,9 %) eines gelben Schaums [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): $R_f = 0,66$; FAB-MS: $m/z = 626$
- 15 ($M+H^+$)].

1.9.b) 20-O-[O-Benzyl-seryl]-camptothecin, Trifluoracetat:

- Eine Lösung von Verbindung 1.9.a (2,5 g, 4,0 mmol) in einer Mischung aus 20 ml Dichlormethan und 4 ml wasserfreier Trifluoressigsäure wird für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Vakuum auf ein kleines Volumen wird das
- 20 Produkt mit Diethylether ausgefällt und gründlich mit Diethylether gewaschen. Man erhält 2,51 g (98,1 %) an gelben Kristallen [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): $R_f = 0,17$; Schmp. = 198°C (Zers.)].

I.9.c) 20-O-[N^α,N^ε-di-(tert-Butoxycarbonyl)-lysyl-(O-benzyl)-seryl]-camptothecin:

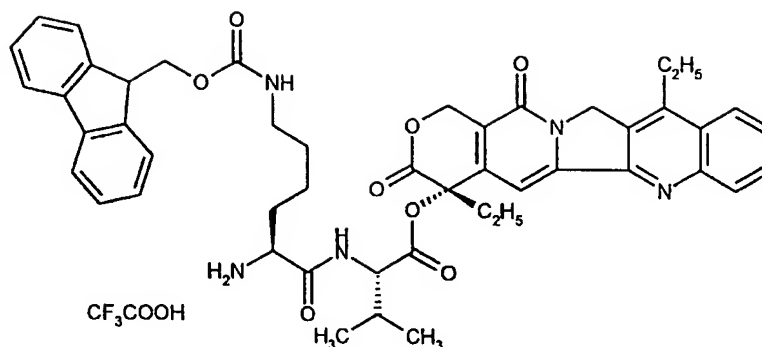
1,73 g (5,0 mmol) N,N-Di-(tert-butoxycarbonyl)-lysin und 1,35 g (10 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst. Nach
5 Zugabe von 1,44 g (7,5 mmol) N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid und 2,0 ml (12 mmol) Ethyl-diisopropylamin rührt man für 15 min. bei Raumtemperatur. Anschließend setzt man eine Lösung aus Verbindung I.9.b (1,92 g, 3,0 mmol) in 50 ml Dimethylformamid und 790 µl (4,5 mmol) Ethyl-diisopropylamin zu und rührt den Ansatz für weitere 16 h bei Raumtemperatur.
10 Nach Einengen im Vakuum wird der Rückstand durch Flashchromatographie [Petrolether/Ethylacetat 3:1 → 1:1 → 1:3] zu gelben Kristallen gereinigt. Ausb.: 2,32 g (89,1 %) [DC (Ethylacetat): R_f = 0,45; Schmp. = 130°C (Zers.)].

I.9) 20-O-(Lysyl-seryl)-camptothecin, Di-Hydrobromid:

Eine Lösung der obigen Verbindung (2,13 g, 2,46 mmol) in Dichlormethan
15 (120 ml) wird mit einer 33%-igen Lösung von Bromwasserstoff in Essigsäure (25 ml) versetzt und die nach wenigen Minuten resultierende Suspension für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Man dekantiert von dem ausgefallenen Produkt ab und wäscht den Rückstand gründlich mit Diethylether. Zur Reinigung wird nach
Lösung in Dichlormethan/Methanol 1:1 durch Zugabe von Diethylether umgefällt.
20 Man erhält 1,78 g (100 %) an gelben Kristallen [DC (Acetonitril/Wasser 5:1): R_f = 0,05].

Beispiel L10

7-Ethyl-20-O-[N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat



I.10.a) 20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-valyl]-7-ethyl-camptothecin:

- Die Verbindung wird unter Verwendung des in I.5.a beschriebenen Verfahrens aus 1,88 g (5,0 mmol) 20(S)-7-Ethyl-camptothecin (S. Sawada et al., Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 1446-1454) und 2,43 g (10,0 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-valin-N-carbonsäureanhydrid hergestellt. Man erhält 1,46 g (51 %) an beigen Kristallen [DC (Acetonitril): $R_f = 0,86$; Schmp. = 224-227°C (Zers.); FAB-MS: $m/z = 576 (M+H^+)$].

I.10.b) 7-Ethyl-20-O-valyl-camptothecin, Trifluoracetat:

- Aus Verbindung I.10.a (1,44 g, 2,5 mmol) wird wie unter I.5.b beschrieben die N-(tert-Butoxycarbonyl)-Gruppe abgespalten. Man erhält 626 mg (43 %) an gelben Kristallen [DC (Acetonitril): $R_f = 0,45$; Schmp. = 160°C (Zers.)].

I.10.c) 20-O-[N $^{\alpha}$ -(tert-Butoxycarbonyl)-N $^{\epsilon}$ -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-7-ethyl-camptothecin:

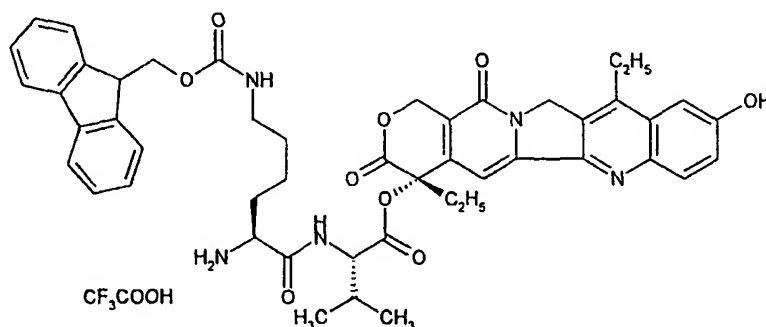
- In Analogie zu I.5.c werden 797 mg (1,7 mmol) N $^{\alpha}$ -(tert-Butoxycarbonyl)-N $^{\epsilon}$ -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysin mit Verbindung I.10.b (590 mg, 1,0 mmol) umgesetzt. Nach Einengen im Vakuum und Reinigung durch Flashchromatographie [Petrolether/Ethylacetat 1:2] erhält man beige Kristalle. Ausb.: 287 mg (31 %) [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,50$; Schmp. = 172°C (Zers.)].

I.10) 7-Ethyl-20-O-[N^F-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat:

Obige Verbindung (277,8 mg, 0,3 mmol) wird wie beschrieben mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan entschützt. Man erhält 209 mg (74 %) an gelben Kristallen [DC (Ethylacetat): $R_f = 0,06$; Schmp. = 199°C (Zers.)].

Beispiel I.11

7-Ethyl-20-O-[N^F-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-10-hydroxy-camptothecin, Trifluoracetat



10 I.11.a) 20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-valyl]-7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin:

Die Verbindung wird unter Verwendung des in I.5.a beschriebenen Verfahrens aus 392,4 mg (1,0 mmol) 20(S)-7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin (S. Sawada et al., Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 3183-3188) und insgesamt 2,43 g (10,0 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-valin-N-carbonsäureanhydrid innerhalb von 6 Tagen hergestellt. Man erhält nach Flash-Chromatographie [Petrolether/Ethylacetat 5:1 -> 2:1 -> 1:1] 353 mg (45 %) an hellgelben Kristallen [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): $R_f = 0,63$; Schmp. = 95-97°C].

I.11.b) 7-Ethyl-10-hydroxy-20-O-valyl-camptothecin, Trifluoracetat:

20 Aus Verbindung I.11.a (340 mg, 0,43 mmol) wird wie unter I.5.b beschrieben die N-(tert-Butoxycarbonyl)-Gruppe abgespalten. Man erhält 255 mg (98 %) an gelben Kristallen [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): $R_f = 0,04$; Schmp. = 189°C (Zers.)].

I.11.c) 20-O-[N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin:

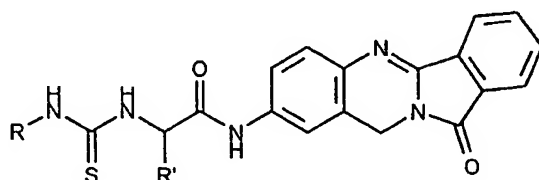
In Analogie zu I.5.c werden 562,3 mg (1,2 mmol) N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysin mit Verbindung I.11.b (242,2 mg, 0,4 mmol) umgesetzt. Nach Einengen im Vakuum und Reinigung durch Flashchromatographie [Petrolether/Ethylacetat 5:1 → 3:1 → 1:1] erhält man gelbe Kristalle. Ausb.: 251 mg (67 %) [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): R_f = 0,68; Schmp. = 163°C (Zers.)].

I.11) 7-Ethyl-20-O-[N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-10-hydroxy-camptothecin, Trifluoracetat:

Obige Verbindung (244,9 mg, 0,26 mmol) wird wie beschrieben mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan entschützt. Man erhält 115 mg (46 %) an gelben Kristallen [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): R_f = 0,05; Schmp. = 196°C (Zers.)].

Beispiele 1.1 - 1.3

15 Konjugate des Batracylins mit einer Aminosäure; allgemeine Formel:



1.1) N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-D-alanyl]-batracin

Edukt: N-(D-alanyl)-batracin

20 Ausb.: 76 % [DC (Ethylacetat/Eisessig 100:1): R_f = 0,53; Schmp.: 185 °C]

1.2) N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]-batracin

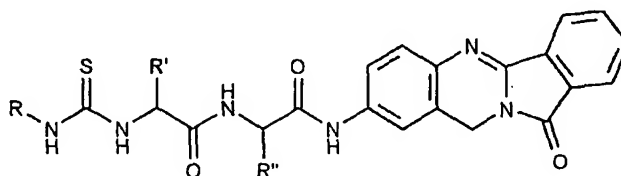
Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-batracin, Trifluoracetat

25 Ausb.: 68 % über 2 Stufen [DC (Dichlormethan/Methanol 5:1): R_f = 0,31; Schmp.: 162 °C (Zers.)]

- 1.3) N-[N^ε-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]-batracylin**
 Edukt: N-[N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-lysyl]-batracylin
 Ausb.: 71% über 2 Stufen [DC (Dichlormethan/Methanol 5:1): R_f = 0,30;
 Schmp.: 162 °C (Zers.)]

5 **Beispiele 1.4 - 1.8**

Konjugate des Batracylins mit zwei Aminosäuren; allgemeine Formel:

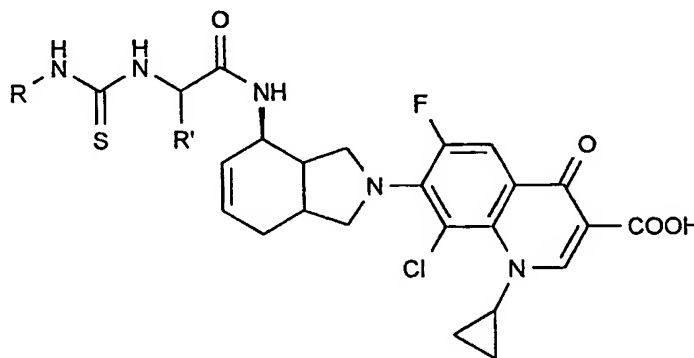


- 1.4) N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-batracylin**
 10 Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-batracylin, Trifluoracetat,
 Ausb.: 70 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): R_f = 0,36]
- 1.5) N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-seryl-D-alanyl]-batracylin**
 15 Edukt: N-(Seryl-D-alanyl)-batracylin, Trifluoracetat
 Ausb.: 45 % [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17 %-ig 15:2:0,2): R_f = 0,32]
- 1.6) N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-glutamyl-D-alanyl]-batracylin**
 20 Edukt: N-(Glutamyl-D-alanyl)-batracylin
 Ausb.: 70 % [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17 %-ig 15:8:0,8): R_f = 0,68]

- 1.7) **N-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-seryl]-batracylin**
 Edukt: N-(Lysyl-seryl)-batracylin, Di-Trifluoracetat
 Ausb.: 46 % [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17 %-ig 15:3:0,2):
 5 R_f = 0,24; Schmp.: 155-157 °C (Zers.)]
- 1.8) **N-{N^α-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]-α,β-diaminopropionyl}-batracylin**
 Edukt: N-[N^α-Lysyl-N^β-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-α,β-diaminopropionyl]-batracylin, Di-Trifluoracetat
 10 Ausb.: 39 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): R_f = 0,54]

Beispiele 2.1 - 2.10

Konjugate des Chinolons-a mit einer Aminosäure; allgemeine Formel:



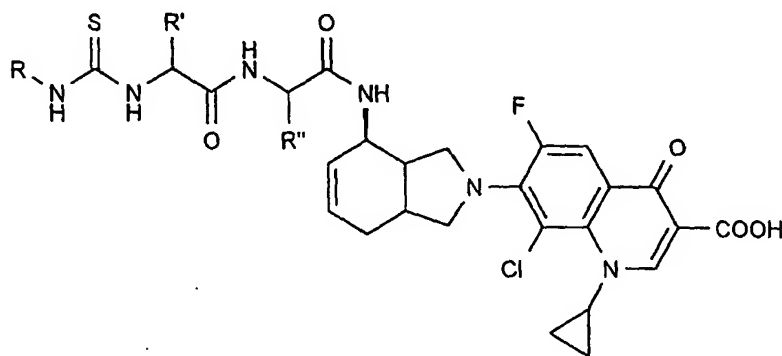
- 15 2.1) **N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-alanyl]-chinolon-a**
 Edukt: N-(Alanyl)-chinolon-a, Trifluoracetat
 Ausb.: 48 % [DC (Acetonitril/Wasser 10:1): R_f = 0,55]
- 20 2.2) **N-[N-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-D-alanyl]-chinolon-a**
 Edukt: N-(D-Alanyl)-chinolon-a, Trifluoracetat
 Ausb.: 61 % [DC (Dichlormethan/Methanol/Eisessig 90:10:1): R_f = 0,38]

- 2.3) **N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-α,γ-diamino-buteryl]-chinolon-a, Hydrochlorid**
Edukt: N-[N^γ-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-α,γ-diaminobuteryl]-chinolon-a, Trifluoracetat
5 salzfreie Vorstufe: 60 % über 2 Stufen [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17 %-ig 10:10:3): R_f = 0,51; Schmp.: 221 °C (Zers.)]
Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Wasser suspendiert und der pH-Wert mit 0,1 N Salzsäure auf 2-3 eingestellt. Nach Filtration wird das Filtrat lyophilisiert.
10
- 2.4) **N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]-chinolon-a, Hydrochlorid**
Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-chinolon-a, Trifluoracetat
15 Ausb.: 74 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): R_f = 0,33]
- 2.5) **N-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-D-lysyl]-chinolon-a**
Edukt: N-(D-Lysyl)-chinolon-a, Di-Trifluoracetat
20 Ausb.: 59 % [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): R_f = 0,33; Schmp.: 186 °C]
- 2.6) **N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-ornithyl]-chinolon-a, Hydrochlorid**
Edukt: N-[N^δ-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-ornithyl]-chinolon-a, Trifluoracetat
25 salzfreie Vorstufe: 47 % über 2 Stufen [DC (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17 %-ig 10:10:3): R_f = 0,36; Schmp.: 211 °C (Zers.)]
Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Wasser suspendiert und der pH-Wert mit 0,1 N Salzsäure auf 2-3 eingestellt. Nach Filtration wird das Filtrat lyophilisiert.
30
- 2.7) **N-[N^α-(Phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]-chinolon-a**
Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-chinolon-a, Trifluoracetat

- Ausb.: 58 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): $R_f = 0,48$]
- 2.8)** N-[N^α-(4-Isothiocyanato-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]-chinolon-a
- 5 Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-chinolon-a, Trifluoracetat
- Ausb.: 73 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): $R_f = 0,38$]
- 2.9)** N-[N^α-(4-Carboxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl]-chinolon-a
- 10 Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-chinolon-a, Trifluoracetat
- Ausb.: 62 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 10:3:1,5): $R_f = 0,6$]
- 2.10)** N-[N^α-(Phenyl-methyl-amino-thiocarbonyl)-lysyl]-chinolon-a
- 15 Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-chinolon-a, Trifluoracetat
- Ausb.: 59 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): $R_f = 0,44$]

Beispiel 2.11

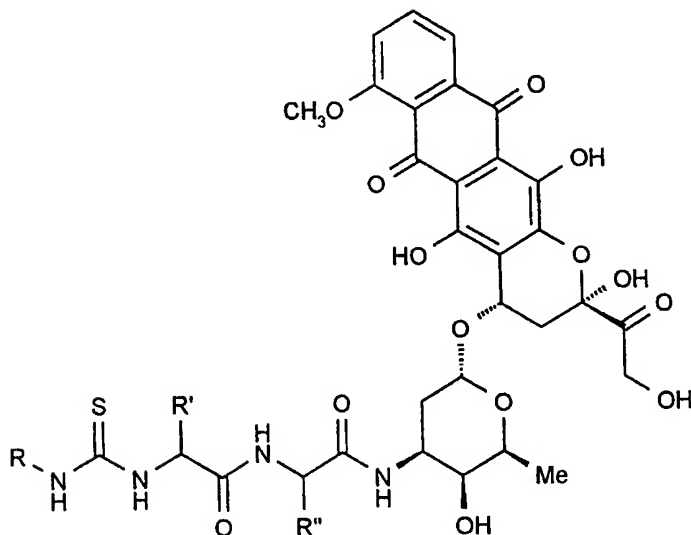
- 20 Konjugate des Chinolons-a mit zwei Aminosäuren; allgemeine Formel:



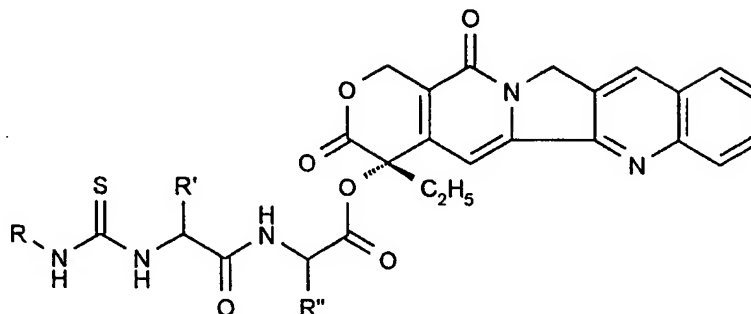
- 2.11) **N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-chinolon-a**
 Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-chinolon-a
 Trifluoracetat
 5 Ausb.: 53 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2) R_f = 0,33]

Beispiel 3

Konjugate des Doxorubicins; allgemeine Formel:



- 10 3) **N-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-alanyl]-doxorubicin**
 Edukt: N-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-doxorubicin,
 Trifluoracetat,
 Ausb.: 46 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): R_f =
 15 0,2; FAB-MS: m/z = 894 (M+H)⁺]

Beispiele 4.1 - 4.11**Konjugate des 20(S)-Camptothecins; allgemeine Formel:**

- 5 4.1) **20-O-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin**
 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin, Trifluoracetat
 Ausb.: 80 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): R_f = 0,32]
- 10 4.2) **20-O-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-leucyl]-camptothecin, Hydrochlorid**
 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-leucyl]-camptothecin, Trifluoracetat
 salzfreie Vorstufe: 71 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): R_f = 0,48]
 15 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.
- 20 4.3) **20-O-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-phenylalanyl]-camptothecin**
 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-phenylalanyl]-camptothecin, Trifluoracetat

- Ausb.: 75 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): $R_f = 0,33$]
- 4.4) 20-O-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid
- 5 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
- salzfreie Vorstufe: 68 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): $R_f = 0,35$; FAB-MS: $m/z = 727 (M+H)^+$]
- 10 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.
- 4.5) 20-O-[N^α-(4-Carboxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid
- 15 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
- salzfreie Vorstufe: 79 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): $R_f = 0,46$]
- 20 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.
- 4.6) 20-O-[N^α-(4-Chlor-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid
- 25 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
- salzfreie Vorstufe: 86 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 10:1:0,1): $R_f = 0,24$]
- 30 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

- 4.7) **20-O-[N^α-(Phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid**
 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
 5 salzfreie Vorstufe: 67 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): R_f = 0,5]
 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.
 10
- 4.8) **20-O-[N^α-(Phenyl-methyl-amino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid**
 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
 15 salzfreie Vorstufe: 55 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): R_f = 0,5]
 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.
 20
- 4.9) **20-O-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin**
 Edukt: 20-O-(Lysyl-alanyl)-camptothecin, Di-Trifluoracetat
 Ausb.: 64% [DC (Acetonitril/Wasser 10:1): R_f = 0,72]
- 25 4.10) **20-O-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-D-alanyl]-camptothecin**
 Edukt: 20-O-(Lysyl-D-alanyl)-camptothecin, Di-Trifluoracetat
 Ausb.: 77% [DC (Acetonitril/Wasser 20:1): R_f = 0,40; FAB-MS: m/z = 850 (M+H)⁺]
- 30 4.11) **20-O-[N^α,N^ε-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-phenylalanyl]-camptothecin**
 Edukt: 20-O-(Lysyl-phenylalanyl)-camptothecin, Di-Trifluoracetat
 Ausb.: 84% [DC (Acetonitril/Wasser 20:1): R_f = 0,6]

4.12) 20-O-[N^α-(3-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat

5 salzfreie Vorstufe: 58 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): R_f = 0,03; Schmp. = 195 °C (Zers.); FAB-MS: m/z = 727 (M+H)⁺]

10 Hydrochlorid: Die Verbindung wird mit Wasser versetzt und die Suspension mit 1 N-Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die resultierende Lösung wird über Celite filtriert und anschließend lyophilisiert.

4.13) 20-O-[N^α-(2-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat

15 salzfreie Vorstufe: 36 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): R_f = 0,03; Schmp. = 192 °C (Zers.); FAB-MS: m/z = 727 (M+H)⁺]

20 Hydrochlorid: Die Verbindung wird mit Wasser versetzt und die Suspension mit 1 N-Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die resultierende Lösung wird über Celite filtriert und anschließend lyophilisiert.

4.14) 20-O-[N^α-(4-Methoxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat

25 salzfreie Vorstufe: 54 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): R_f = 0,06; Schmp. = 195 °C (Zers.); FAB-MS: m/z = 741 (M+H)⁺]

30 Hydrochlorid: Die Verbindung wird mit Wasser versetzt und die Suspension mit 1 N-Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die resultierende Lösung wird über Celite filtriert und anschließend lyophilisiert.

4.15) 20-O-[N^α-(3-Methoxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat

salzfreie Vorstufe: 65 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): $R_f = 0,08$; Schmp. = 197 °C (Zers.); FAB-MS: $m/z = 741$ (M+H)⁺]

5 Hydrochlorid: Die Verbindung wird mit Wasser versetzt und die Suspension mit 1 N-Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die resultierende Lösung wird über Celite filtriert und anschließend lyophilisiert.

4.16) 20-O-[N^α-(4-Nitro-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

10 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat

salzfreie Vorstufe: 86 % über 2 Stufen [DC: (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): $R_f = 0,5$].

15 Hydrochlorid: Die Verbindung wird mit Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

4.17) 20-O-[N^α-(3-Nitro-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

20 Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat

25 salzfreie Vorstufe: 46 % über 2 Stufen. Die Reinigung auf der Fmoc-geschützten Zwischenstufe erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1). Anschließend erfolgt die Deblockierung mit Piperidin. [DC: (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2): $R_f = 0,45$;

Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert. [FAB-MS: $m/z = 756$ (M+H)⁺].

30 4.18) 20-O-[N^α-(4-Amino-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

Edukt: 20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat

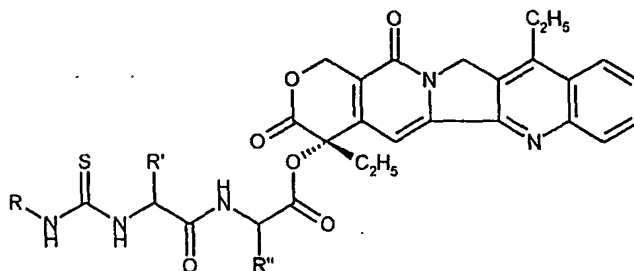
mono-Fmoc-geschütztes p-Phenylen-diamin:

- Dieses wird aus Phenylendiamin mit 0,5 Äq. Fmoc-Cl ohne weiteren Basenzusatz hergestellt. Anschließend wird es nach Standardbedingungen in das Senfö1 überführt.
- 5 salzfreie Vorstufe: 46 % über 2 Stufen. Die Reinigung auf der Fmoc-geschützten Zwischenstufe erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 50:1). Anschließend erfolgt die Deblockierung mit Piperidin. Die Reinigung erfolgt dann erneut durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17 %ig 15:1:0,1). [DC: (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2) $R_f = 0,45$]
- 10 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert [FAB-MS: $m/z = 726 (M+H)^+$].
- 15
- 4.19) 20-O-[N $^{\alpha}$ -(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-histidyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid**
- Edukt: 20-O-[Histidyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
- salzfreie Vorstufe: 81 % [DC: (Acetonitril/Wasser 10:1 $R_f = 0,4$)]
- 20 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.
- 4.20) 20-O-[N $^{\alpha}$ -(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-leucyl]-camptothecin, Hydrochlorid**
- 25 Edukt: 20-O-[N $^{\epsilon}$ -(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat
- salzfreie Vorstufe: 71 % über 2 Stufen [DC (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2) $R_f = 0,45$]
- 30 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

- 4.21) 20-O- $\{[N^{\alpha}\text{-}N^{\epsilon}\text{-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)]\text{-lysyl-valyl}\}$ -camptothecin, Hydrochlorid
Edukt: 20-O- $\{[Lysyl\text{-}[N^{\epsilon}\text{-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)]\text{-lysyl}\text{-valyl}]\}$ -camptothecin, Bis-Trifluoracetat
5 salzfreie Vorstufe: 79 % über 2 Stufen.
[DC: (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2) $R_f = 0,46$];
[FAB-MS: $m/z = 1006 = (M+H)^+$].
Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit
10 einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid
überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend
lyophilisiert.
- 4.22) 20-O- $[N^{\alpha},N^{\epsilon}\text{-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)]\text{-lysyl-aspartyl}$ -camptothecin, Natriumsalz
Edukt: 20-O-(Lysyl-aspartyl)-camptothecin, Di-Hydrobromid
15 salzfreie Vorstufe: 50 % - die Reinigung erfolgt durch mehrmaliges Umfällen
aus Dichlormethan/Methanol 1:1 mit Diethylether [DC
(Acetonitril/Wasser 5:1): $R_f = 0,58$; Schmp. = 192 °C
(Zers.); FAB-MS: $m/z = 894 (M+H)^+$].
Natriumsalz: Die Verbindung wird in Wasser suspendiert und mit einem
20 Äquivalent einer 0,1 N-Natronlauge versetzt. Die resultie-
rende Lösung wird anschließend lyophilisiert.
- 4.23) 20-O- $[N^{\alpha},N^{\epsilon}\text{-bis-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)]\text{-lysyl-seryl}$ -camptothecin
Edukt: 20-O-(Lysyl-seryl)-camptothecin, Di-Hydrobromid
25 Ausb.: 36 % - die Reinigung erfolgt durch Flashchromatographie [Petrol-
ether / Ethylacetat 2:1 \rightarrow 1:2 \rightarrow Ethylacetat] [DC (Acetonitril): $R_f =$
0,70; Schmp. = 183 °C (Zers.); FAB-MS: $m/z = 866 (M+H)^+$].

Beispiel 5

Konjugate des 20(S)-7-Ethyl-camptothecins; allgemeine Formel:



5.1) 7-Ethyl-20-O-[N^α,N^ε-bis-(4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin

Edukt: 7-Ethyl-20-O-(lysyl-alanyl)-camptothecin, Di-Trifluoracetat
 Ausb.: 27 % [DC (Acetonitril): R_f = 0,68; Schmp. = 122 °C (Zers.);
 FAB-MS: m/z = 879 (M+H)⁺].

5.2) 7-Ethyl-20-O-[N^ε-(4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

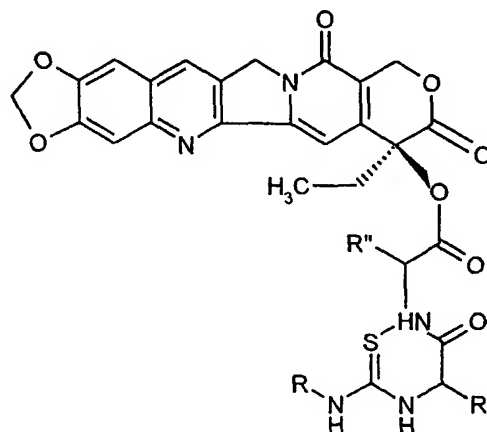
Edukt: 7-Ethyl-20-O-[N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Trifluoracetat

salzfreie Vorstufe: 61% über 2 Stufen [beige Kristalle; DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): R_f = 0,02; Schmp. = 220 °C (Zers.); FAB-MS: m/z = 755 (M+H)⁺].

Hydrochlorid: Die Verbindung wird mit Wasser versetzt und die Suspension mit 1 N-Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die resultierende Lösung wird über Celite filtriert und anschließend lyophilisiert.

Beispiel 6

Konjugate des 10,11-(Methylenedioxy)-camptothecins; allgemeine Formel:



- 5 6) **10,11-(Methylenedioxy)-20-O-[N^α-(4-Hydroxy-phenylaminothio-carbonyl)-lysyl-leucyl]-camptothecin, Hydrochlorid**

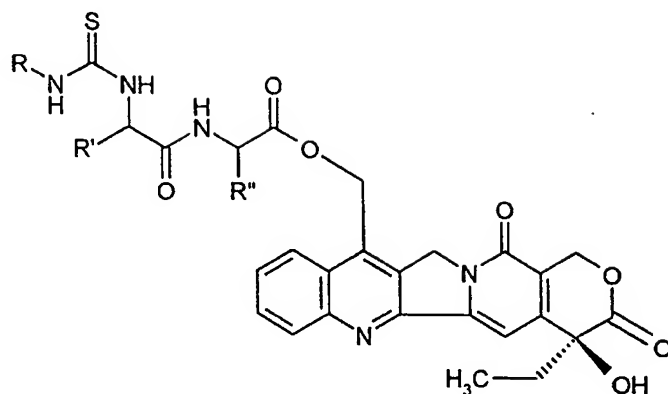
Edukt: 10,11-(Methylenedioxy)-20-O-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxy-carbonyl)-lysyl-leucyl]-camptothecin, Trifluoracetat

salzfreie Vorstufe: 90 % über 2 Stufen [DC: (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2) R_f = 0,43]

- 10 Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

Beispiel 7

- 15 **Konjugate des 7-Hydroxymethyl-camptothecins; allgemeine Formel**



7) 7-[N^α-(4-Hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyloxymethyl]-camptothecin, Hydrochlorid

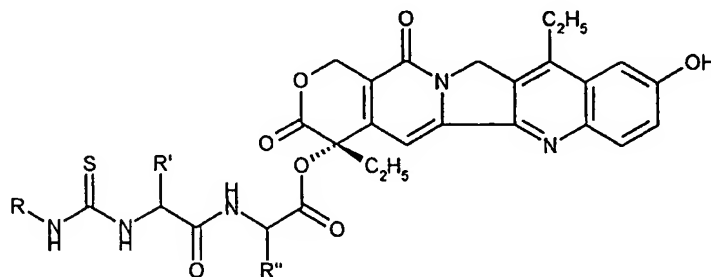
Edukt: 7-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxy-carbonyl)-lysyl-valyloxymethyl]-camptothecin, Trifluoracetat

salzfreie Vorstufe: 60 % über 2 Stufen. Die Reinigung auf der Fmoc-geschützten Zwischenstufe erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1). Anschließend erfolgt die Deblockierung mit Piperidin. [DC: (Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2) R_f = 0,54]

Hydrochlorid: Die Verbindung wird in Dioxan/Wasser gelöst und mit einem Äquivalent einer 0,1 N Salzsäure ins Hydrochlorid überführt. Die resultierende Lösung wird anschließend lyophilisiert.

15 **Beispiel 8**

Konjugate des 20(S)-7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecins; allgemeine Formel:



8) 7-Ethyl-10-hydroxy-20-O-[N^α-(4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-lysyl-valyl]-camptothecin, Hydrochlorid

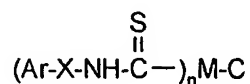
Edukt: 7-Ethyl-20-O-[N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-valyl]-10-hydroxy-camptothecin, Trifluoracetat

5 salzfreie Vorstufe: 69% über 2 Stufen [beige Kristalle; DC (Acetonitril/Ethylacetat 1:1): R_f = 0,03; Schmp. = 225 °C (Zers.); FAB-MS: m/z = 771 (M+H)⁺]

10 Hydrochlorid: Die Verbindung wird mit Wasser versetzt und die Suspension mit 1 N-Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Die resultierende Lösung wird über Celite filtriert und anschließend lyophilisiert.

Patentansprüche

1. Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



worin

5 $(\text{Ar-X-NH-C}(=\text{S})\text{---})_n$ für 1 bis n' gleiche oder voneinander verschiedene Grup-

pierungen $\text{Ar-X-NH-C}(=\text{S})\text{---}$ steht, wobei n eine Zahl 1 bis n' bedeutet und n'

der maximalen Zahl möglicher Anknüpfungsstellen von M entspricht,

worin

10 Ar für einen Arylrest mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen steht, der zusätzlich zu X gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert sein kann durch Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Alkoxycarbonyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Carboxy, Carboxylalkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Cyano, Nitro, Isocyanato, Isothiocyanato, Halogen, Sulfonyl und/oder Sulfonamid,

X für eine direkte Einfachbindung oder für Alkylen mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen steht,

20 M für ein Mono-, Di-, Tri- oder Tetrapeptid steht, das über die α -Aminogruppe und/oder über Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit den n gleichen oder voneinander verschiedenen

Gruppierungen $\text{Ar-X-NH-C}(=\text{S})\text{---}$ verknüpft ist, wobei weitere

- funktionelle Gruppen des Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können, und
- 5 C für einen Rest eines Cytostatikums oder eines Cytostatikum-Derivats steht, das über eine Aminofunktion oder über ein Sauerstoffatom mit M verknüpft ist,
- sowie deren Stereoisomere, Stereoisomerengemische und Salze.
2. Verbindungen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
- Ar für einen Phenylrest steht, der para-ständig zu X noch Hydroxy, Carboxy, Isothiocyanato oder Halogen tragen kann,
- 10 sowie deren Stereoisomeren, Stereoisomerengemische und Salze.
3. Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß
- X für eine Einfachbindung oder für Methylen steht,
- sowie deren Stereoisomeren, Stereoisomerengemische und Salze.
- 15 4. Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß
- M für ein Mono-, Di oder Tripeptid steht, das über die α -Aminogruppe und/oder Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit den 1 bis n gleichen oder voneinander verschiedenen Gruppierungen
- 20
$$\text{Ar-X-NH-C} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \end{array} \text{—}$$
 verknüpft ist, wobei weitere funktionelle Gruppen des Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können.,
- sowie deren Stereoisomeren, Stereoisomerengemische und Salze.
5. Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide M aus Aminosäureresten bestehen, die sich ab-

5 leiten von Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Leusin, Histidin, Lysin, Arginin, Ornithin, Serin, Tyrosin, Valin oder Diaminopropionsäure, wobei mehrere Aminosäurereste sowohl über die α -Aminogruppe als auch gegebenenfalls über die Seitenketten-Aminofunktionen und auch über beide Funktionen peptidisch verknüpft sein können,

sowie deren Stereoisomere, Stereoisomerengemische und Salze.

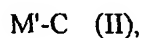
6. Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß C für einen Batracylin-, Methotrexat-, Chinolon-a-, Etoposid-, Melphalan-, Taxol-, Camptothecin-Rest, ein im A-Ring oder B-Ring modifiziertes Camptothecin-Derivat, einen Daunomycin- oder Doxorubicin-Rest steht, wobei C über eine Amino- oder Hydroxyfunktion mit M verknüpft ist,

10

sowie deren Stereoisomere, Stereoisomerengemische und Salze.

7. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

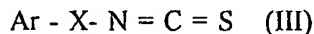
15



worin C die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat und M' für einen in Anspruch 1 definierten Rest M steht, der an den gewünschten Verknüpfungsstellen Wasserstoffatome trägt und dessen übrige potentielle Verknüpfungsstellen durch Schutzgruppen blockiert sind,

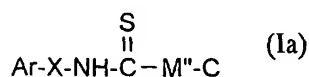
20

mit Verbindungen der allgemeinen Formel (III)



in geeigneten Lösemitteln in Gegenwart einer Base zu Verbindungen der allgemeinen Formel (Ia)

25



umsetzt,

worin Ar, X und C die oben angegebenen Bedeutungen haben und M" für einen Rest M steht, dessen weitere potentielle Verknüpfungsstellen durch Schutzgruppen blockiert sind,

5 und im Fall der Einführung weiterer Gruppen

$\text{Ar-X-NH-C} \begin{smallmatrix} \text{S} \\ || \end{smallmatrix} \text{---}$, die sich von der bzw. den zunächst eingeführten

unterscheiden, die entsprechenden Schutzgruppen gegebenenfalls selektiv von den Verbindungen der Formel (Ia) abspaltet, diese in der oben angegebenen Weise mit weiteren Verbindungen der allgemeinen Formel
10 (III), die sich von den zunächst eingeführten unterscheiden, umsetzt und gegebenenfalls diese Reaktionssequenz zu Einführung weiterer von den

eingeführten Resten verschiedener Reste $\text{Ar-X-NH-C} \begin{smallmatrix} \text{S} \\ || \end{smallmatrix} \text{---}$ wiederholt,

und daß man verbleibende Schutzgruppen gegebenenfalls abspaltet,

15 daß man weiterhin gegebenenfalls nach üblichen Methoden die Stereoisomeren trennt und daß man gegebenenfalls die Verbindungen in ihre Salze überführt.

8. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln.

20 9. Arzneimittel enthaltend Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/05189

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6: C07K 5/04, A61K 47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6: C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REG. CAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 9631532 A1 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT), 10 October 1996 (10.10.96)	1-9
X	Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis, Band 24, 1976 Zdzislaw Macho'n, "SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF DERIVATIVES OF 3-METHYL-5- AMINOISOTHIAZOLO-4-CARBOXYLIC ACID", page 863 - page 870, see page 865, compound XVI	1-9
X	Chem. Pharm. Bull., Band 29, No 3, 1981, Tomohiko Munakata et al, "Some Structure-Activity Relationships for Bactobolin Analogs in the Treatment of Mouse Leukemia P388 1)", page 891 - page 894, see table 1, compound 8	1-9
A	EP 0233841 A1 (CIBA-GEIGY AG), 26 August 1987 (26.08.87)	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
22 January 1998 (22.01.98)

Date of mailing of the international search report
25 February 1998 (25-02.98)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Telephone No.

SA 1746

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

07/01/98

International application No.

PCT/EP 97/05189

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9631532 A1	10/10/96	AU 5397696 A	23/10/96
		DE 19512484 A	17/10/96
		NO 974564 A	25/11/97
EP 0233841 A1	26/08/87	AU 6887787 A	20/08/87
		DK 79687 A	19/08/87
		JP 62223182 A	01/10/87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05189

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C07K 5/04, A61K 47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C07K

Recherche, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

REG. CAPLUS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 9631532 A1 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT), 10 Oktober 1996 (10.10.96) --	1-9
X	Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis, Band 24, 1976, Zdzislaw Macho'n, "SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF DERIVATIVES OF 3-METHYL-5-AMINOISOTHIAZOLO-4-CARBOXYLIC ACID", Seite 863 - Seite 870, siehe Seite 865, Verbindung XVI --	1-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T

Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X

Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y

Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann absehbar ist

Z

Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22 Januar 1998

25.02.98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Bevollmächtigter Bediensteter



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Carolina Gómez Lagerlöf

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05189

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Chem.Pharm.Bull., Band 29, Nr 3, 1981, Tomohiko Munakata et al, "Some Structure-Activity Relationshipsfor Bactobolin Analogs in the Treatment of Mouse Leukemia P388 1)", Seite 891 - Seite 894, siehe tabelle 1, Verbindung 8 ---	1-9
A	EP 0233841 A1 (CIBA-GEIGY AG), 26 August 1987 (26.08.87) -- -----	1-9

SA 174' '5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTAngaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören
07/01/98

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05189

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9631532 A1	10/10/96	AU 5397696 A	23/10/96
		DE 19512484 A	17/10/96
		NO 974564 A	25/11/97
<hr/>			
EP 0233841 A1	26/08/87	AU 6887787 A	20/08/87
		DK 79687 A	19/08/87
		JP 62223182 A	01/10/87
<hr/>			